

R 214

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**CULTIVO *in vitro*:**  
**RESGATE DE EMBRIÕES EM VIDEIRA**

Relatório de estágio de conclusão de curso, apresentado como um dos requisitos parciais para a obtenção do título de Engenheiro Agrônomo, pela Universidade Federal de Santa Catarina.



0.283.122-0

UFSC-8U

LUCIANO JUNQUEIRA SULZBACH

Florianópolis (SC), setembro de 1998.

R 214  
Ex. 1

### **AGRADECIMENTOS**

- A meus pais , Lourêço T. Sulzbach e Beatriz J. Sulzbach , irmãs e demais familiares pelo apoio prestado durante o curso de Agronomia.
- Ao orientador Aparecido Lima da Silva , pelo acompanhamento prestado na realização do estágio e demais atividades.
- Aos supervisores Paulo Ricardo .Dias Oliveira, Adriane Amaral e demais pesquisadores, funcionários e estagiários do CNPUV-EMBRAPA que cooperaram para a realização do estágio.
- Aos amigos, colegas, professores e funcionários do Centro de Ciências Agrárias – UFSC, que me acompanharam durante o curso de graduação em agronomia.

## **ÍNDICE**

1. Apresentação	03
2. Introdução	04
3. Revisão	07
4. Materiais e Métodos	11
5. Resultados e Discussão	15
6. Conclusão	17
7. Anexos	18
8. Bibliografia	23

## **1. APRESENTAÇÃO**

O estágio foi realizado no laboratório de cultura de tecidos do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPUV – EMBRAPA) em Bento Gonçalves, Rio Grande do Sul, durante o período de 01 (um) de janeiro à 31 (trinta e um) do mesmo mês, do ano de 1998 (um mil, novecentos e noventa e oito).

Durante este período foram acompanhadas e desenvolvidas as atividades de um laboratório de cultura de tecidos, destinado ao processo de Resgate de Embriões. Todas as etapas desde a limpeza e desinfecção dos materiais até o resgate *in vitro* dos embriões, bem como o seu desenvolvimento, a micropropagação, aclimação das plântulas, além de sua transferência para a casa de vegetação.

O enfoque do trabalho foi o Resgate de Embriões; de variedades de videira destinadas ao consumo *in natura*, visando a obtenção de uvas de mesa apirênicas, ou seja, sem sementes.

O trabalho foi realizado sob a orientação do Professor Aparecido Lima da Silva, do Departamento de Fitotecnia, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina. A supervisão na empresa foi realizada pelo Eng-Agr Paulo Ricardo Dias de Oliveira e com co-supervisão da Eng-Agr Adriane C. Amaral, Bolsista do DTI CNPq – BIOEX.

## **2. INTRODUÇÃO**

Atualmente, com a entrada de produtos estrangeiros e o aumento da oferta de produtos no mercado, os consumidores estão se tornando cada vez mais exigentes. Desta forma os produtores devem melhorar a qualidade do seu produto, além de apresentá-lo ao mercado de acordo com as preferências dos consumidores. Para que os produtores de uvas de mesa recebam preços melhores e tenham condições de vender sua produção, é necessário o cultivo de variedades adequadas à preferência do mercado consumidor.

Com relação a produção brasileira, 25% é destinada ao consumo *in natura*, sendo as cultivares Isabel e Niágara as mais representativas em termos de consumo, representando 73% da produção brasileira de uvas. Atualmente, a produção em áreas de vinhedo, concentra-se basicamente na Região Sul do país, totalizando 82,3% da produção nacional. O estado do Rio Grande do Sul caracteriza-se por ser o maior produtor nacional com 69,8% do volume produzido.

Visando atender estas exigências, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária está desenvolvendo variedades de uvas de mesa sem semente, para serem lançadas no mercado nacional.

Com o desenvolvimento de variedades apirênicas para o mercado brasileiro, o país terá condições de competir na comercialização de uvas de mesa tanto visando abastecer o mercado nacional, como o mercado internacional.

Neste trabalho do Centro Nacional de Pesquisa de Uva e Vinho, além de buscar cultivares apirênicas, procura obter também outras características como tamanho de bagas e quantidade por cacho. Busca-se um tamanho de bagas médio, com aproximadamente 19 milímetros de diâmetro. Quanto ao número de bagas, procura-se cachos medianamente

compactos, porque cachos com alta densidade de bagas tornam-se muito compactos e, assim, causam danos ao epicarpo dos frutos. Favorecendo, então, o aparecimento de fungos que causam a perda do produto.

Dessa forma, busca-se nas metodologias, tais como, a biotecnologia, a técnica do resgate de embriões para acelerar o desenvolvimento de videiras apirênicas, diminuindo o procedimento de obtenção de plantas melhoradas em aproximadamente 5 anos.

As plântulas obtidas no resgate de embriões são micropropagadas, obtendo-se um maior número de plantas com mesma composição genética da planta matriz.

No melhoramento e seleção de novas variedades de uvas de mesa, busca-se a criação de cultivares apirênicas, ou seja, sem semente. Verifica-se ser esta uma tendência do mercado internacional. Segundo Ledbetter e Ramming (1989), cultivares estenoespermocarpicas representam 85% das uvas de mesa e uvas passa do mercado mundial.

Para se alcançar a produção de cultivares apirênicas, por estenoespermocarpia, pode-se utilizar duas técnicas. A mais antiga utiliza genitores femininos pirênicos, que garantirão a produção da semente e, doadores de pólen (genitor masculino) com o genótipo apirênico. Descendentes desses cruzamentos eram cruzados, ou retrocruzados, com progenitores, para então surgir a progênie com descendentes apirenos. Nesta técnica obtém-se uma progênie com 25% em média, do carácter apirênico. A outra técnica, que nos garante 100% de descendentes apirênicos, se baseia na utilização de cultivares apirênicos nas hibridizações, desta forma o resgate do embrião faz-se necessário antes que ocorra o aborto, tendo-se o cuidado de se coletar a semente – traço na época adequada.

A cultura *in vitro* de embriões de rudimentos seminais e de sementes teve início com o trabalho de Hanning (1940), que obteve “seedlings” de embriões maduros de dois gêneros de crucífera, *Raphanus* e *Cochlearia*.

Segundo Pescador, citando Pasqual & Pinto (1988) e Andreoli (1985), essa técnica permite estudos mais aprofundados nas áreas de fisiologia e melhoramento vegetal, possibilitando o resgate de embriões híbridos imaturos, oriundos de cruzamentos incompatíveis. Uma das práticas mais comuns aplicadas à técnica de cultura de embriões é a obtenção de plântulas híbridas em cruzamentos interespecíficos, onde ocorrem barreiras sexuais na formação da semente.

Segundo Singh e Brar (1992), ocorre a fertilização e o desenvolvimento do embrião, e logo após, o aborto da semente. Então realiza-se o cultivo *in vitro*, até o momento em que a plântula estiver pronta para o processo de aclimação.

A técnica do resgate de embrião para videira apresenta um grande potencial a ser desenvolvido, com relação a programas clássicos de melhoramento vegetal.

Segundo Passos *et al* (1992), a cultura de embriões combina as vantagens da hibridização convencional e da tecnologia da cultura de tecidos, ao mesmo tempo que permite a obtenção de genótipos utilizando embriões que de outra forma abortariam. E no caso da videira, a técnica do resgate de embriões permitiu o cruzamento entre variedades que apresentavam apirenia. A porcentagem de plantas na F1 provenientes de sementes traço varia de 16,7% a 33,3%, dependendo do cruzamento (TSOLOVA *et alli*, 1998).

A técnica de resgate de embriões usada atualmente, foi desenvolvida por pesquisadores do Horticultural Corp Research Laboratory (HCLR), Califórnia, EUA, a partir do ano de 1982 e alterou os rumos da obtenção de cultivares com a presença do genótipo responsável pela apirenia.

Com o objetivo de produzir uvas de mesa sem semente, a EMBRAPA-CNPUV, está desde 1992, juntamente com o Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), São Paulo,

estabelecendo e adaptando a técnica do resgate de embriões “*in vitro*” desenvolvida pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA).



### **3. REVISÃO**

Segundo Pasqual *et al* , na cultura de embriões, estes estão localizados num ambiente estéril dentro do óvulo e, portanto, antes de sua remoção basta desinfestar a superfície externada semente que contém o óvulo , ou mesmo do fruto que contém as sementes. Devido a isto que observa um índice de contaminação, em cultura de embriões , menor que em outros tipos de cultura *in vitro*”.

A excisão de um embrião imaturo que está embebido em endosperma líquido, frequentemente envolve uma incisão na extremidade micropilar do óvulo jovem e a aplicação de pressão na extremidade oposta para forçar a saída do embrião. É importante que os embriões não sejam injuriados por ocasião desta operação.

Durante o processo de excisão os embriões devem ser mantidos com suficiente umidade até serem transferidos para o meio de cultura. O embrião em seu desenvolvimento apresenta quatro fases : globular , cordiforme , torpedão e adulto.

O embrião adulto , com raras exceções, é uma estrutura bipolar plenamente desenvolvida , consistindo de um meristema em cada extremidade, a radícula ou primórdio radicular e plúmula ou primórdio foliar e , um ou dois apêndices laterais, os cotilédones.

O meio de cultura é o ambiente onde deve ocorrer a maturação do embrião, sendo este então , o responsável de suprir as suas necessidades nutricionais.

O pH do meio de cultura deve se situar entre 5,0 a 6,0, sendo este valor recomendado por um grande número de pesquisadores , devido a testes realizados por Asano & Myodo (1977) em *Lilium* com pH variando de 3,8 a 7,4. O ajuste do pH deve objetivar o valor 6,0, sendo que após a autoclavagem do meio de cultura irá se reduzir para

aproximadamente 5,5. O meio sólido é mais indicado a cultura de embriões e recomenda-se uma quantidade de ágar variando entre 0,5 a 1,5%. O ágar deve ter uma concentração baixa que permita ao meio suportar fisicamente o peso do embrião, sendo o ponto ideal uma simples gelificação. Isso porque um meio de cultura muito sólido causa redução na disponibilidade de água ao embrião (PASQUAL *et al*).

A utilização do carvão ativado é recomendada para restringir a difusão de metabólitos tóxicos produzidos pelos embriões, e contornar alguns problemas oriundos de substâncias detrimenais contidas no ágar (PASQUAL *et al*), também pode reduzir substâncias inibidoras de crescimento, como 5-hidroximetilfurfural proveniente da autoclavagem da sacarose, assim como substâncias promotoras de crescimento como auxinas e citocininas (TEIXEIRA, 1995).

A sacarose é fonte de energia muito comum em meios de cultura utilizados no cultivo de embriões, os carboidratos promovem crescimento de raízes ou primórdios radiculares ou foliares e tem importância na osmopolaridade do meio de cultura, que atua na inibição ao processo de alongamento celular.

O uso dos reguladores de crescimento só ocorre quando os embriões são resgatados muito jovens, este suprimento ocorre para inibir a germinação precoce ou estimular o crescimento do embrião.

As auxinas desde que aplicadas em pequenas quantidades, estimulam o crescimento do primórdio radicular e brotações, enquanto que concentrações elevadas levarão a produção de calos. As citocininas tem efeito muito complexo pela presença de interações com auxina e caseína hidrolizada e dependem da idade do embrião no momento de sua excisão. A diferenciação e crescimento do embrião pode ser promovida com a interação entre citocininas e IAA, e para que ocorra a morfogênese as citocininas precisam estar presente em baixa concentração.

O ácido giberélico apresenta grande influência no desenvolvimento de embriões maduros de sementes dormentes. Sua ação pode superar a dormência dos embriões , promover o alongamento de raízes, pode superar a necessidade de luz de algumas sementes. Enquanto o etileno promove o crescimento do embrião, o ácido abscísico(ABA) atua na inibição deste, isto devido provavelmente a sua ação sobre a síntese do RNA(PASQUAL *et. al.*).

O nitrogênio que é suprido na forma de nitrato de amônio possui influência significativa no crescimento e desenvolvimento dos embriões , assim como a caseína hidrolizada .

Segundo Pasqual *et al*, as vitaminas não tem se mostrado indispensáveis, pois, é provavel que sendo autotróficas , os embriões são capazes de satisfazer suas necessidades em vitaminas pela biossíntese celular.

Segundo Fachinello *et al* (1994) , o conceito da totipotencialidade foi postulado por Haberlandt. Este conceito associado a hipótese do balanço hormonal, proposto por Skoog & Miller (1957), torna possível o estudo da morfogênese *in vitro*, e sua aplicação na micropopagação . O conceito de micropopagação é “o desenvolvimento de novas plantas em um meio artificial sob condições assépticas a partir de pequenos propágulos ( explantes )”.

A micropopagação em cultura de embriões, ocorre com o objetivo de obter um maior número de plântulas originárias de um único explante. Estes clones são uma das categorias básicas da cultivar e designa um conjunto geneticamente uniformen de um indivíduo simples por propagação assexuada.

A propagação se dá através da obtenção de um explante que fixado em cultura asséptica será dividido para que ocorra sua multiplicação. Então será depositado em vários recipientes contendo meio de cultura onde ocorre o enraizamento, que é induzido pela presença no meio de cultura do Ácido Giberélico (GA) sendo que este apresenta efeito direto

na iniciação do desenvolvimento da raiz ou no desencadeamento do desenvolvimento inicial de raízes pré-formadas (GUERRA *et alii*).

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no laboratório de cultura de tecidos da EMBRAPA-CNPUV. Todo o processo inicia-se quando da chegada dos cachos provenientes dos cruzamentos realizados no ano de 1997 entre variedades apirênicas de *Vitis vinifera*.

As bagas chegam presas aos cachos e embaladas separadamente, de acordo com sua variedade ou cruzamento.

A retirada das bagas se dá com o corte de cada uma do cacho, trabalho este realizado com o uso de tesouras. Após este processo as bagas são acondicionadas em Beckers para a realização da desinfecção e, conseqüentemente, a eliminação de agentes contaminantes que possam causar danos a sementes, os fungos.

O processo de desinfecção utilizado foi lavagem das bagas por dois minutos em álcool 70%, após coloca-se hipoclorito de sódio em solução comercial 100% e faz-se a lavagem por cinco minutos. Ao final deste processo lava-se as bagas com água deionizada e autoclavada, para que não restem resquícios de álcool e hipoclorito de sódio.

Após o processo de desinfecção, as bagas são colocadas em uma câmara fria e ficam depositadas até o momento de se realizar a retirada da semente.

O processo de retirada das sementes da baga, ocorre após 6 (seis) semanas da polinização; é feita dentro de uma câmara de fluxo laminar, com objetivo de se obter um mínimo de contaminação por fungos presentes no ambiente. A baga é firmada com o uso de uma pinça e então realiza-se o corte desta para a retirada das sementes, sendo que seu número pode variar entre 0 (zero) e 4 (quatro) unidades.

As sementes são depositadas em placas de Petry, autoclavadas contendo meio de cultura Emershad & Ramming semi-sólido. Estes recipientes após receberem identificações (variedade e cruzamentos) são imediatamente depositados na sala de crescimento, com

imediatamente depositados na sala de crescimento, com temperatura variando em aproximadamente 25°C e luminicência em torno de 2000 LUX, onde permanecerão por um período de 8 (oito) semanas , quando serão retirados e levados a câmara de fluxo laminar novamente, para se efetuar o resgate dos embriões. O cultivo da semente ocorre para que não ocorra o aborto do embrião, devido ao aborto do endosperma e a proliferação anormal das células do integumento e pela incapacidade do endosperma em nutrir os embriões.

Para a retirada do embrião os materiais utilizados, são pinça, estilete, bisturi, papel filtro e placa de Petry onde serão guardados os embriões até serem transferidos para o meio de cultura.

A preperação do meio de cultura deve ser realizada com os ingredientes listados a seguir , solução stock # 1-50 ml , Stock #2 –50 ml , microelementos –5 ml , vitaminas-5 ml , Myo Inositol-50 mg , caseína hidrolizada-50 mg , L-Cisteína 1211,6 mg , sacarose 60 g , e tendo o seu pH regilado no valor 6,0. O ajuste do pH é realizado no pHmetro com a adição de soluções 0,1 N de HCL e 0,1 N de KOH .

Para a solidificação de meio de cultura adiciona-se 6 gramas de Ágar e 3 gramas de carvão ativado.

As soluções Stock # 1, Stock # 2 , Stock # 3 e Stock # 4 apresentam a seguinte composição.

**Solução Stock # 1 gm/litro**

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	12,0
KNO <sub>3</sub>	3,2
KCl	1,3
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	7,2

**Solução Stock # 2 gm/litro**

Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,0
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	15,0
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0,38

**Solução Stock #3(microelementos)                      mg/100 ml**

MnSO4 H2O	60,0
H3BO3	10,0
ZnSO4 7H2O	10,0
CoCl2 6H2O	0,5
CuSO4 5H2O	0,5
NaMoO4 2H2O	0,5
Citrato de Ferro	200,0

**Solução Stock # 4 (vitaminas)                      mg/100ml**

Tiamina HCl	5,6
Piridoxina HCl	5,0
Pantotanato de Ca	5,0
Glicina	60,0

Para a excisão do embrião, deve-se realizar um corte longitudinal na semente que esta sendo firmada pela pinça e tendo-se o cuidado de não causar injúria no embrião. Após a remoção dos tegumentos testa e tegmen, externo e interno, respectivamente.

Os embriões, excisados e depositados em meio de cultura são colocados na sala de crescimento para que ocorra o desenvolvimento “in vitro” (Anexos 1 e 2). Após a germinação e desenvolvimento das plântulas , estas são micropropagadas e repicadas para que se tenha um maior número de indivíduos com mesmo genótipo (Anexos 3 e4).

Quando as plântulas atingirem um porte que permitirá seu transplante, elas serão levadas para a sala de aclimação, onde serão retiradas dos tubos de ensaio e terão suas raízes lavadas em água corrente para se retirar o excesso de meio cultura que fica preso as raízes.

Depois as plantas são colocadas em copos plásticos contendo  $\frac{1}{2}$  de solo orgânico e  $\frac{1}{2}$  de Vermiculita (Anexo 5).

As plantas permanecerão na sala de aclimação até que haja uma lignificação suficiente do caule que permitira o seu transplante, indo para a casa de vegetação (Anexos 6 e 7), sendo esta uma das etapas críticas da micropropagação. As plantas estavam em local com condições de ambiente artificiais, e com menor quantidade de ceras epicuticulares tornam-se suscetíveis a perda de água devido a pouca funcionalidade dos estômatos.

Após o seu transplante as plantas etiquetadas e separadas de acordo com o seu cruzamento e tamanho, e ficam depositadas na casa de vegetação até o instante em que atinjam tamanho suficiente para que ocorra o seu plantio a campo.

As mudas ficam depositadas neste local sobre bancadas de madeira e, são, analisadas freqüentemente para se definir quais as plantas já atingiram o tamanho adequado para o plantio.

O plantio a campo das plantas é realizado na cidade de Jales, no estado de São Paulo, sendo neste local onde se realizam as observações das cultivares, os cruzamentos e as polinizações a campo. Sendo este processo realizado conjuntamente entre Técnicos e pesquisadores do CNPUV-EMBRAPA e do Instituto Agronômico de Campinas (IAC).



## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados obtidos no Laboratório de Cultura de Tecidos, do CNPUV – EMBRAPA, se situam dentro dos valores de obtenção de plantas provenientes do resgate de embriões, citados na bibliografia.

Um dos motivos que levaram o resgate de embriões em *Vitis vinifera* no CNPUV foram o uso dos protocolos tanto para o a cultura de óvulos ou sementes, quanto para a cultura de embriões.

Os fatores que foram observados época de retirada das sementes dos frutos, período em que estas ficaram em meio de cultura, excisão do embrião, tempo de cultivo dos embriões, propagação dos explantes, período na sala de crescimento, sala de aclimação e transferência para casa de vegetação .Todos estes fatores foram realizados com observações especiais da assepsia dos materiais e do e de quem as realiza.

TABELA 01 – Eficiência atingida para obtenção de plantas aperênicas em *Vitis vinifera* no CNPUV esta em 14%, uma vez que 33% dos óvulos contém embriões e que 43% destes originam plantas (média de 1996 a 1998).

cruzamentos 1997/98	número			%	
	semente	embrião	plântulas	Embrião/ semente	Plantas/ Embrião
CNPUV 183-44 x Catalunha	30	3	1	15	33
Feal x Mars	24	7	2	29	29
Ruby Sds x Mars	339	63	25	19	40
CNPUV 154-72 x A 1976	1	0	0	0	0
CNPUV 154-7 x Crimson Sds	10	1	0	10	0
CNPUV 154-22 x Crimson Sds	35	12	3	34	25
CNPUV 154-7 x Fantasy	27	0	0	0	0
CNPUV 157-192 x A1976	176	103	36	60	34
CNPUV 154-56 x A1976	5	0	0	0	0
CNPUV 154-85 x Fantasy	15	0	0	0	0
CNPUV 154-22 x Superior Sds	20	7	3	35	43
CNPUV 154-147 x Superior	179	76	33	43	43
CNPUV 175-50 x 154-22	10	2	1	20	50
CNPUV 154-85 x Centennial	12	0	0	0	0
CNPUV 174-43 x Fantasy	8	6	3	75	50
CNPUV 154-90 x Marroo Sds	4	2	2	50	100
CNPUV 154-56 x Centennial	7	2	1	29	50
CNPUV 154-28 x Fantasy	18	0	2	33	33
CNPUV 154-141 x Muscat Sds	9	0	0	0	0
CNPUV 154-141 x Centennial	12	0	0	0	0
CNPUV 247-3 x Crimson	17	6	0	35	0
CNPUV 247-1 x Centennial	45	6	1	13	17
CNPUV 154-85 x Crimson	15	0	0	0	0
CNPUV 247-3 x A1976	38	6	2	16	33,3
Muscat sds x CNPUV 154-100	22	5	2	23	40
CNPUV 154-85 x Muscat Sds	63	0	0	0	0
Total	1141	307	117		
Média				32	41

## **6. CONCLUSÃO/ PERSPECTIVAS**

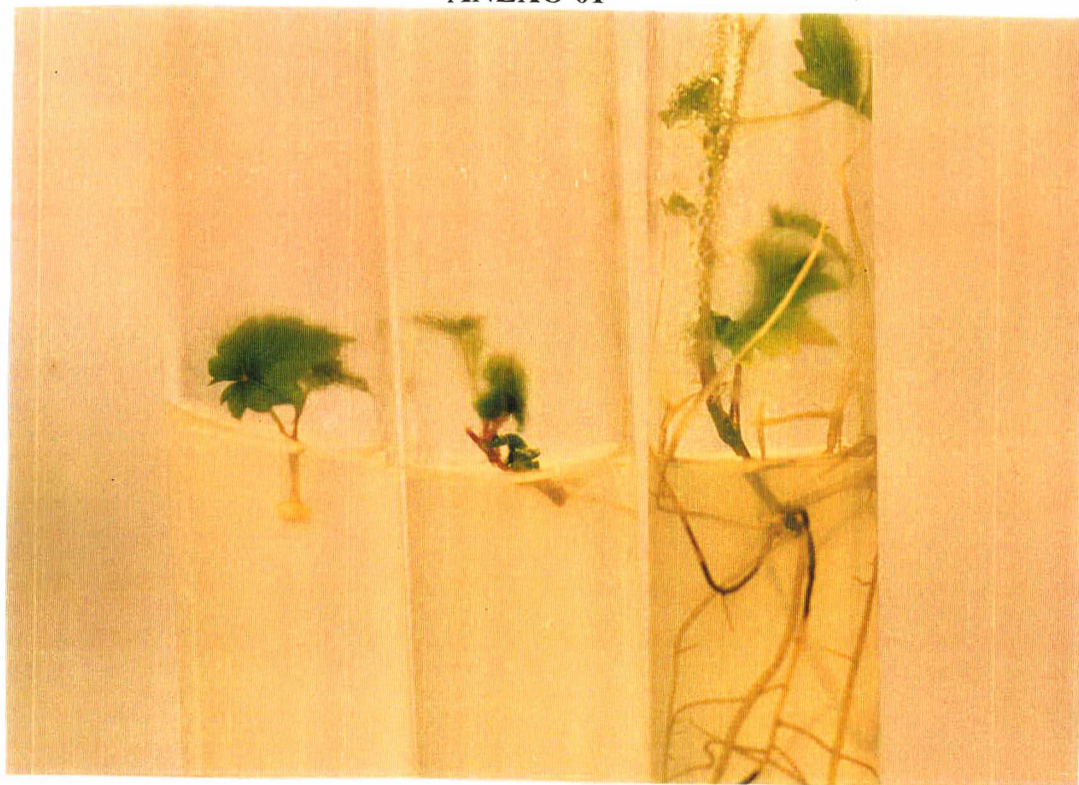
As vantagens do método de cruzamento entre variedades sem sementes é a obtenção de uma progênie 100% apirênica, enquanto que no método que utiliza genitores femininos pirênicos e masculinos apirênicos , teremos na progênie apenas 25% dos descendentes apirênicos. Desta forma teríamos um período, em anos, muito superior para o desenvolvimento de variedades de uvas de mesa sem semente.

O uso da técnica da micropropagação em conjunto com a técnica do resgate de embriões, nos propiciam um grande número de propágulos em curto espaço de tempo, a manutenção da identidade clonal dos explantes se comparado com as formas convencionais de obtenção de mudas.

Esta técnica nos apresenta a perspectiva de ser usada para muitas outras culturas além das viníferas, como para os *Citrus sp*, *Brassica sp* , em cruzamentos do gênero *Carica* e em cultivares precoces de pessegueiros.

## **7.ANEXOS**

**ANEXO 01**



**ANEXO 02**





ANEXO 03



ANEXO 04





ANEXO 05



ANEXO 06



## ANEXO 07





## **8. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

AMARAL, A. L.; OLIVEIRA, P.R.D.; CAMARGO, U.A.; **Uvas de Mesa sem Sementes por Aplicação do Técnica de Resgate de Embriões *in vitro***. Bento Gonçalves, 1997. P.36-37.

BOUQUET, A.; DAVIS, H.P., **Culture *in vitro* d'ovules et Démbryons de Vigne (*Vitis vinifera* L.) Appliquée à la Sélection de Variétés de Raisins de Table sans Pépins**. Agronomie, Elsevier/INRA. França, 1989. 09 p.

EMBRAPA. **Vênus-Uva Precoce para Mesa**. Bento Gonçalves, 1993. Comunicado Técnico N°13, 4 p.

EMBRAPA. **Dona Zilá e Tardia de Caxias- Uvas Tardias para Mesa**. Bento Gonçalves, 1994. Comunicado Técnico N°14, 4 p.

EPAGRI. **Cadeias Produtivas do Estado de Santa Catarina: Viticultura**. Florianópolis, 1997. Boletim Técnico N° 83.

FACHINELLO, J.C.; *et al*; **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. Pelotas: UFPEL, 1994. 1° Edição.

GUERRA, M.P.; TORRES, A.C.; TEIXEIRA, J.B. **Embriogênese Somática e Sementes Sintéticas**. 19 p.

GRIBAUDO, I. *Et alli*; **In Ovulo Embryo Culture of Stnospermocarpic grapes** Torino- Italia, 1993 .Vitis p.9-14.

MULLINS, M.G.; **Tissue Culture and the Genetic Improvement of Grapevines: A Review**. Davis-CA (U.S.A.), 1996. Department of Viticulture and Enology. 12 p.

OLMO, H.P. **Breeding Seedless Grapes** . France, 1973 . 12 p.

PASQUAL, M.; PINTO, J.E.B.P..ABCT Notícias ,p.3-9.

PASSOS, I.R.da S.: *et alli*.Obtenção de híbridos entre cultivares apirênicas de videira, utilizando a técnica de Resgate de Embrões. Cruz das Almas, 1992. Revista Brasileira de Fruticultura, v.14, n. 2, p.215-220.

PESCADOR, R.; Cultivo de embriões de laranjeira "Cipó" (*Citrus sinensis* Osb) *in vitro* uso de padrões isoenzimáticos na identificação dos "Seedlings" zigóticos e nucelares. Porto Alegre: UFRGS, 1993. 96

RAMMING, D.W.; The Use of Embryo Culture in Fruit breeding. Fresno -U.S.A, 1990. HortScience, vol 24(4). 5 p.

SINGH, Z.; BRAR, S.J.S.; *In vivo* development of ovule in seedless and cultivars of grapes (*Vitis vinifera* L.) - a particular reference to *in ovulo* embryo culture. Ludhiana- India, 1991. Vitis 31, 77-82 (1992).,

STRIEN, M.J.; SPIEGEL-ROY,P.; BARON, I.; SAHAR,N.The degrees of development of the seed-coat and the endosperm as separate subtraits of stenospermocapic seedlessness in grapes. Bet Dagan, Israel, 1992. 6 p.

TEIXEIRA,J.B. Embriogênese Somática-Curso de Cultura de Tecidos de Plantas CBAB/CNPH. Brasília -DF.1995.

TSOLOVA, V.; ATANASSOV, A.; TRIFONOVA, D.; VALTCHEV, V.. The primary results from stdy of F1 and I1 plants *in vitro* embryo culture of seedless grapes.Vllème SYMPOSIUM INTERNATIONAL SUR LA GENETIQUE ET LÁMELIORATION DE LA VIGNE . Montpellier , 6-10 juillet 1998. Resumes, P 5.13